PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 7 :

A61K 47/46, A61P 17/00, A61K 31/17, 38/46

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:

WO 00/38732

A1

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:

6. Juli 2000 (06.07.00)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP99/10337

(22) Internationales Anmeldedatum:

22. Dezember 1999

(22.12.99)

(30) Prioritätsdaten:

198 60 545.5

23. Dezember 1998 (23.12.98) DE

- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): ES-PARMA GMBH [DE/DE]; Lange Göhren 3, D-39171 HANS-KNÖLL-INSTITUT Osterweddingen (DE). FÜR NATURSTOFF-FORSCHUNG E.V. [DE/DE]; Beutenbergstrasse (DE).D-07745 Jena 11a. FRIEDRICH-SCHILLER-UNIVERSITÄT **JENA** [DE/DE]; Fürstengraben 1, D-07743 Jena (DE). IN-STITUT FÜR ANGEWANDTE DERMATOPHARMAZIE AN DER MLU, UNIVERSITÄT HAUTKLINIK [DE/DE]; Ernst-Kromayer Strasse 5-8, D-06097 Halle (DE).
- (71)(72) Anmelder und Erfinder: WOHLRAB, Wolfgang [DE/DE]; Beesener Strasse 221 C, D-06110 Halle (DE). NEUBERT, Reinhard [DE/DE]; Schwuchstrasse 11F, D-06120 Halle (DE).

(72) Erfinder; und

- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HUSCHKA, Christoph [DE/DE]; Gustav-Hertzberg-Strasse 8, D-06110 MÜLLER, Peter-Jürgen [DE/DE]: Halle (DE). Hans-Knöll-Institut für Naturstoff-Forschung e.V Jena, Beutenberg Strasse 11, D-07745 Jena (DE). OZEGOWSKI, Jörg-Herman [DE/DE]; Institut für experimentelle Mikrobiologie der FSU Jena, D-07745 (DE). KOEGST, Dieter [DE/DE]; Esparma GmbH, Lange Göhren 3, D-39171 Osterweddingen (DE), FRIES, Gerhard [DE/DE]; Esparma GmbH, Lange Göhren 3, D-39171 Osterweddingen (DE).
- (74) Anwalt: PRENNING MEINIG & PARTNER GBR; Mozart-strasse 17, D-80336 München (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

- (54) Title: HYALURONATE LYASE USED FOR PROMOTING PENETRATION IN TOPICAL AGENTS
- (54) Bezeichnung: HYALURONATLYASE ALS PENETRATIONSFORDERER IN TOPISCHEN MITTELN

(57) Abstract

The invention relates to agents for treating skin diseases and/or functional disorders of the skin by promoting penetration from topical formulations into the skin, said agents being based on different medicaments and/or auxiliary substances. According to the invention, the agent consists of a microbially produced hyaluronate lyase and a medicament, preferably a hydrophilic problem medicament, and/or auxiliary substances, processed into different galenic preparations including colloidal carrier systems. The invention is suitable for use in the areas of human and veterinary medicine for the therapy, prophylaxis and/or metaphylaxis of skin diseases, functional disorders of the skin, skin ageing processes and dry skin conditions.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft Mittel zur Behandlung von Hauterkrankungen und/oder Funktionsstörungen der Haut auf der Basis unterschiedlicher Arzneistoffe und/oder Hilfsstoffe durch Penetrationspromotion aus topischen Formulierungen in die Haut. Erfindungsgemäß setzt sich das Mittel aus einer mikrobiell hergestellten Hyaluronatlyase und einem Arzneistoff, vorzugsweise ein hydrophiler Problemarzneistoff und/oder Hilfsstoffen in unterschiedlichen galenischen Formulierungen einschließlich kolloidaler Trägersysteme eingearbeitet, zusammen. Die Anwendungsgebiete der Erfindung in der Human- und der Veterinärmedizin betreffen die Therapie, Prophylaxe und/oder Metaphylaxe von Hauterkrankungen, Funktionsstörungen der Haut, die Vorgänge der Hautalterung sowie trockene Hautzustände.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
$\mathbf{A}\mathbf{M}$	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
\mathbf{AU}	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
\mathbf{AZ}	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
\mathbf{BF}	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
\mathbf{BG}	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
\mathbf{BJ}	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
\mathbf{CG}	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neuseeland	$\mathbf{z}\mathbf{w}$	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	\mathbf{PL}	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
\mathbf{CZ}	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

WO 00/38732 PCT/EP99/10337

1

Mittel für die topische Anwendung enthaltend Penetrationsförderer

Die Erfindung betrifft ein topisch anwendbares Mittel, das Hyaluronatlyasen zur Penetrationsmodulation von einem oder mehreren Wirkstoffen und/oder Arzneistoffen zur kosmetischen und medizinischen Behandlung von Haut, Schleimhaut, Haaren und/oder Nägeln, wie z.B. zur Behandlung von Erkrankungen oder Funktionsstörungen menschlicher oder tierischer Haut, Schleimhaut, Haare und/oder Nägel enthält.

Arzneistoffe und/oder Wirkstoffe werden zusammen mit Hilfsstoffen in Form von flüssigen, halbfesten oder auch festen Formulierungen unterschiedlicher Zusammensetzung zur Behandlung, Prophylaxe und Metaphylaxe von Funktions- und Strukturstörungen der Haut und/oder Schleimhaut eingesetzt. In Abhängigkeit von den physikochemischen Eigenschaften des Wirk- bzw.

10

15

WO 00/38732 PCT/EP99/10337

5

10

15

20

25

30

35

Arzneistoffes, der verwendeten Grundlage und der darin enthaltenen Hilfsstoffe sowie der Beschaffenheit des zu behandelten Areals der Haut, dringen die Wirkstoffmoleküle über verschiedene Penetrationsmechanismen in die Haut ein, im gegebenen Falle durchdringen sie diese bis zur Resorption durch das Gefäßsystem.

2

Die Haut ist durch ihre natürliche Barrierefunktion gegenüber der Umwelt gekennzeichnet. Somit kann sie dem Vordringen von äußerlich angewendeten Substanzen und/oder Substanzgemischen entgegenwirken. Die eingesetzten Wirk- und/oder Arzneistoffe bzw. die coapplizierten Hilfsstoffe müssen die Barriere des Stratum corneums überwinden, um in der angestrebten Gewebsschicht (Epidermis, Dermis, bzw. auch in den Follikeln und dem Gefäßsystem) die Wirkung zu entfalten.

Es ist bereits seit langem bekannt, daß durch die Anwesenheit von einem oder mehreren speziellen Hilfsstoffen die Penetration von Wirkstoffen erleichtert werden kann (Penetrationsmodulation). Dabei sind diese Stoffe in der Lage, über unterschiedliche, teilweise nicht vollständig geklärte Wirkungsmechanismen, die Penetration bzw. Permeation von Wirk- und/oder Arzneistoffen zu verändern.

Eine als Enhancereffekt bezeichnete Wirkung besitzen beispielsweise Dimethylsulfoxid, Dimethylacetamid, Dimethylformamid, Derivate des Polyethylenglycol und des Propylenglycol, Polyoxyethylenester, Alkanolamide, Alkanolamine, Alkylamine, N-Alkylpyrrolidone, Diethylenglycolmonoethylether oder Fettsäureglycolester (U.S. 5,912,009), 1-Dodecylazacycloheptan-2-on, Menthol (U.S. Pat. Nr. 4,933,184), pflanzliche

PCT/EP99/10337

5

10

15

20

25

30

35

3

Öle (U.S. Pat. 5,229,130) Isopropylmyristat (U.S. Nr. 5,618,555), Eukalyptusöl (U.S. Pat.Nr. 4,440,777), Fettsäureester von Milchsäure (U.S. Pat. Nr. 5,882,676 und 5,952,000) und Lecithin (U.S. No. 4,783,450).

Im U.S. Pat. Nr. 5,296,222 wird ein perkutanes Freisetzungssystem beschrieben, welches Lactamverbindungen (z. B. 1-substituiertes Azacycloheptan-2-on) und Propylenglycol enthält. Das U.S. Pat. Nr. 3,989,816 und 4,316,893 beschreibt ebenfalls die Anwendung von Lactamverbindungen.

In der japanischen Offenlegung Pat. Ser. Nr. 91-251534, werden Pflaster mit erhöhter Penetrationsfähigkeit für Piroxicam durch Anwesenheit von Polyoxyethylenalkylether oder Alkanolamide als Penetrationsbeschleuniger für das basische Arzneimittel Triacetin beschrieben (U.S. No. 5,834,010). Weitere Penetrationsbeschleuniger werden in der U.S. Pat. Nr. 4,755,535 (Azacycloalken), U. S. Pat. Nr. 4,699,777, (1 -Dodecylazacycloheptan-2-on und Harnstoff zur Aufnahme von Albuterol), U.S. Pat. Nr. 4,820,711 und U.S. Pat, Nr. 4,557,934 (Arzneimittel gelöst in Azone oder Azone-Derivate) vorgeschlagen.

Das Schutzrecht U.S. Nr. 5,914,322 und Nr. 5,962,433 beschreibt topisch einsetzbare Zubereitungen mit therapeutischer Anwendung bei pathologischen und traumatischen Erscheinungen der Haut, bei der Hyaluronsäure als Transportförderer des Wirkstoffes enthalten ist, Die im U.S. Patent Nr. 5,624,915 und 5,631,242 genannten Kompositionen enthalten Hyaluronsäure, Harnstoff und einen pharmazeutischen Hilfs- und/oder Wirkstoff mit breiter Anwendung gegen verschiedene Haut- und Schleimhauterkrankungen.

WO 00/38732

5

10

15

20

25

30

35

PCT/EP99/10337

4

Für die Erhöhung der Penetration von hydrophilen Substanzen wurden auch Enzyme als Penetrationsbeschleuniger vorgeschlagen. Die penetrationsfördernde Eigenschaft von Hyaluronidase tierischer Herkunft, insbesondere aus Rinderhoden gewonnen, ist bekannt. Sie wird beispielsweise in Salbenform angewendet [Steinhaus, Christian und Sperandio, J. Amer. Pharmac. Assoc. Sci. Edit. 44, 483 (1955) und Kalentey und Stenszky, Pharmazie 15, 158, (1960)].

Ein transdermales Freisetzungssystem mit Penetrationsbeschleuniger wird in den französischen Schutzrechten Nr. 2,448,903 und 2,556,218 beschrieben. Die transdermalen Zubereitungen enthalten neben den Arznei- bzw. Wirkstoffen wie z. B. ein Antibiotikum (Tetracyklin) und/oder ein Lokalanesthetikum (Lidocain) und/oder entzündungshemmende Arzneistoffe (Acetylsaliylsäure) und/oder einen emulgierenden oder einen mucolytischen Wirkstoff, Vitamin A sowie als Hilfsstoff Natriumglycerolsterat und/oder mehrere Enzyme als penetrationsfördernden Zusatz. Als Enzyme sind Hyaluronidase, Streptokinase, Streptodornase, Trypsin, Chymotrypsin, alpha-Chymotrypsin, alpha-Amylase, Bromelain, Papain, Desoxyribonuclease, Collagenase und Subtilisin vorgeschlagen worden.

Nachteilig an den genannten Systemen zur Penetrationsförderung ist, daß sie zu Irritationen der Haut führen können. Die Anwesenheit von Proteasen, als auch der als Penetrationsbeschleuniger vorgeschlagenen Lösemittel, führt teilweise zu einer direkten Schädigung der Haut. Bei der Verwendung von Hyaluronidasen boviner Herkunft besteht die Gefahr der Übertragung infektiösen oder antigenen Materials, da sie

WO 00/38732

PCT/EP99/10337

5

in der Regel noch große Mengen anderer tierischer Proteine (auch andere Enzymen) enthalten. Das U.S. Patent Nr. 4,152,212 schlägt eine intensive Reinigungsprozedur für ein Rohprodukt einer aus Rinderhoden oder Lebergewebe gewonnenen Hyaluronidase vor.

Nachteilig ist unter anderem am Einsatz der Rinderhodenhyaluronidase als auch anderer Hyaluronidasen tierischer Herkunft, daß das Enzym aufgrund des hohen Fremdproteingehaltes auch nach aufwendigen Reinigungsschritten nur zu einem Produkt mit geringer spezifischer Aktivität führt. Dadurch können pro cm² Haut nur Aktivitäten kleiner als 1.000 IU aufgebracht werden. Inzwischen werden Präparate aus Rinderprodukten für die Anwendung im Menschen wegen des hohen Risikos, die Bovine Spongioforme Encephalopathia (BSE) zu übertragen, kaum noch eingesetzt. Nachteilig ist weiterhin, das die Hyaluronidase durch sulfatierte Glycosaminoglycane, die in der Haut und generell in der extrazellulären Matrix vorkommen, stark gehemmt wird. Dadurch wird die Aktivität des Enzyms in der Haut bei der Anwendung als Penetrationsförderer wesentlich verschlechtert.

25

30

5

10

15

20

Ausgehend hiervon ist es die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Mittel zur topischen Anwendung anzugeben, mit dem eine effektive Penetrationspromotion der in dem Mittel enthaltenden Wirk- bzw. Arzneistoffe ermöglicht. Das Mittel soll bevorzugt zur therapeutischen Behandlung und/oder Funktionssteuerung der Haut bzw. Schleimheit einsetzbar sein.

6

WO 00/38732 PCT/EP99/10337

Die Aufgabe wird durch die kennzeichnenden Merkmale des Patentanspruches 1 gelöst. Die Unteransprüche zeigen vorteilhafte Weiterbildungen auf.

Erfindungsgemäß wird somit die Penetration von Arzneistoffen deutlich verbessert, wenn neben mindestens einem oder mehreren Wirk- bzw. Arzneistoffen, vorzugsweise hydrophile Wirk- bzw. Arzneistoffe, ein Enzym vom Typ einer Hyaluronatlyase (E.C. 4.2.2.1) als Penetrationsverstärker in Konzentrationen von 100 IU bis 100.000 IU pro g Formulierung, bevorzugt in Konzentrationen von 500 IU bis 5.000 IU pro g Formulierung vorhanden ist und die Formulierungen topisch angewendet werden.

15

20

25

30

35

10

5

Allgemein unterscheidet man drei unterschiedlich wirkende hyaluronsäurespaltende Enzymtypen (J. Ludowieg: The Mechanism of Hyaluronidases, JBC 236, 333-339, (1961)]. Es sind einmal die Endohydrolasen, welche die ß-(1-3)Bindungen hydrolytisch spalten. Zu ihnen gehören die Mehrzahl der Hyaluronidasen aus höheren Organismen, beispielsweise die Hyaluronidase aus Rinderhoden. Diese Hyaluronat-Glycanhydrolasen (Enzymklasse: E.C. 3.2.1.35/36) spalten neben den Bindungen der Hyaluronsäure in einem begrenzten Maße auch andere Glycosaminoglycane. Einen weiteren Typ stellt die Endo-ß-Hyaluronidase aus dem Blutegel dar, welche die ß-(1-4)-Bindung hochspezifisch spaltet. Der dritte Enzymtyp, der erfindungsgemäß verwendet wird, ist die Hyaluronatlyase (Enzymklasse: EC 4.2.2.1). Diese spaltet die Hyaluronsäure in der ß-(1-4)-Bindungen nach einem Eliminierungsmechanismus unter Bildung einer Doppelbindung in (4-5)-Stellung an der Glucuronsäure. Für Lyasen werden in der Literatur Endo- und Exospaltmechanismen angegeben.

WO 00/38732

5

10

15

20

25

30

35

7

PCT/EP99/10337

Die erfindungsgemäße Hyaluronatlyase wird durch mikrobieller Fermentation gewonnen. Als Mikroorganismus
wird in einer Ausführung, ohne dadurch den Schutzumfang einzuengen, ein Mikroorganismus der Gattung
Streptococcus, bevorzugt ein Streptococcus der serologischen Gruppe B oder C, insbesondere der Art
Streptococcus agalactiae eingesetzt.

Ohne die Erfindung im Bezug auf die Herkunft des Enzyms auf einen einzigen Mikroorganismus einzuschränken, soll an Hand des aus Streptococcus agalactiae gewonnen Enzyms die Erfindung beispielhaft beschrieben werden. Das aus den Kulturflüssigkeiten dieses Mikroorganismus hergestellte Enzym besitzt einen Isoelektrischen Punkt von IP = 8,6 und eine Molmasse im Bereich von 116 kD und wirkt nach einem Endo-Spaltmechanismus. Im Verlaufe der Reinigung und Konzentrierung des Enzyms aus dem Kulturfiltrat der Submersfermentation wird in einer weiteren Ausführungsform ein Enzymtrockenpräparat hergestellt und als Trockenpräparat mit einer Aktivität von etwa 10.000 bis 400.000 IU/mg Trockenmasse in die Formulierung eingebracht.

In einer anderen Ausführung wird die Hyaluronatlyase als wäßrige gepufferte Lösung, gegebenenfalls unter Zusatz von Stabilisatoren mit Konzentrationen zwischen 10.000 IU/ml bis 2.000.000 IU/ml in die Formu-

lierung eingebracht.

Die galenische Formulierung kann in Form einer Paste, Salbe, Creme, Emulsion, Gel oder Stiftmasse, bevorzugt als O/W-Emulsion vorliegen. In den Formulierungen können pharmazeutische Träger und/oder hydrophile und/oder lipophile Wirkstoffe und/oder Hilfsstoffe

8

WO 00/38732 PCT/EP99/10337

vorhanden sein. Die Hyaluronatlyase und/oder die Wirkstoffe und/oder Hilfsstoffe können in kolloidalen Trägersystemen, vorzugsweise Nanopartikel, Liposomen oder Mikroemulsionen eingearbeitet vorliegen. Als hydrophiler Wirkstoff kann neben allen anderen hydrophilen Arzneimitteln beispielsweise 8-Methoxypsoralen, Harnstoff, Erythromycin, Cyclopiroxolamin, alle im Konzentrationsbereich von 0,01 bis 0,1 g pro g Formulierung oder neben allen anderen lipophilen Arzneimitteln die lipophilen Wirkstoffe Minocyclin im Konzentrationsbereich zwischen 0,001 bis 0,1 g pro g Formulierung oder Glyceroltrinitrat im Konzentrationsbereich zwischen 0,01 bis 0,5 g pro g Formulierung anwesend sein.

15

20

10

5

Vorteilhaft an den patentgemäßen Formulierungen ist, daß bei Anwendung keine Irritationen der Haut auch bei mehrstündiger Exposition gegenüber den Formulierungen auftreten, die auf das Enzym Hyaluronatlyase zurückzuführen sind. Durch die hohe spezifische Aktivität der Hyaluronatlyase bzw. ihrer hohen Reinheit ist es möglich sehr hohe Aktivitäten pro cm² Hautfläche einzusetzen.

25

Die Erfindung wird nachfolgend anhand von 10 Beispielen und Penetrationsuntersuchungen näher beschrieben.

I. Beispiele: (Quelle für die Grundlage)

	1.	Wasserhaltige Hydrophile Salbe nach DAB 10 mit Harnstoff (D	AB)	
5		Harnstoff		10,00%
		Hyaluronatlyase (2500 IU/cm²)		1,30%
		Lanette® N (Emulgierender Cetylstearylalkohol DAB 10)		9,00%
		Paraffinum subliquidum (Dickflüssiges Paraffin)		10,50%
		Vaselinum album (Weißes Vaselin)		10,50%
		Aqua bidestillata	ad	100,00%
10	2.	Wasserhaltige Wollwachsalkoholsalbe nach DAB mit Harnstoff	(DAB)	
		Harnstoff		10,00%
		Hyaluronatlyase (2500 IU/cm²)		1,30%
		Alcoholes Lanae (Wollwachsalkohole)		3,00%
		Alcohol cetystearylicus (Cetylstearylalkohol)		0,25%
		Vaselinum album (Weißes Vaselin)		46,75%
		Aqua bidestillata	ad	100,00%
15	2	Desirone DAC mit Dolidoganol (frois Dorantum)		
	3.	Basiscreme DAC mit Polidocanol (freie Rezeptur)		5,00%
		Polidocanol 600		1,30%
		Hyaluronatlyase (2500 TU/cm²)		3,00%
		Propylenglykol		•
		Aqua bidestillata	a d	22,00% 100,00%
0.0		Basiscreme DAC	ad	100,0070
20	4.	Hydrophile Triamcinolonacetonid-Creme (NRF)		
		Triamcinolonacetonid (mikrofein)		0,10%
		Hyaluronatlyase (2500 IU/cm²)		1,30%
		Mittelkettige Triglyceride		0,10%
		Basiscreme DAC	ad	100,00%
25	5.	Hydrophile Hydrocortisonacetat-Creme (NRF)		1.0007
		Hydrocortisonacetat		1,00%
		Hyaluronatlyase (2500 IU/cm²)		1,30%
		Nichtionische hydrophile Creme DAB	ad	100,00%
	6.	Harnstoff-Natriumchlorid-Salbe (NRF)		
20		Harnstoff		10,00%
30		Natriumchlorid		10,00%
		Hyaluronatlyase (2500 IU/cm²)		1,30%
		Gereinigtes Wasser		30,00%
		Wollwachsalkoholsalbe DAB	ad	100,00%
		AA OTI AA UOTIOTIOTIOTIO TO LYTA	uu	100,0070

30

	7.	Hydrophile Harnstoff-Emulsion (NRF)		
5		Harnstoff		10,00%
	•	Milchsäuте (90%)		1,00%
		Hyaluronatlyase (2500 IU/cm²)		1,30%
		Natriumlactat-Lösung		4,00%
		Emulsionsgrundlage NRF	ad	100,00%
10	8.	Harnstoff-Creme mit Tretinoin (freie Rezeptur)		
		Harnstoff		12,00%
		Tretinoin		0,03%
		Hyaluronatlyase (2500 IU/cm²)		1,30%
		Basiscreme DAC	ad	100,00%
15				
	9.	Hydrophiles Metronidazol-Gel (NRF)		
		Metronidazol		0,75%
		Propylenglycol		5,00%
		Natriumedetat		0,10%
20		Trometamol		0,25%
20		Polyacrylsäure		0,50%
		Kaliumsorbat		0,10%
		Hyaluronatlyase (2500 IU/cm²)		1,30%
		Gereinigtes Wasser	ad	100,00%
	10	. Unguentum Oxytetracyclini 1% L/W (SR)		
25		Oxytetracyclinum hydrochloricum		1,00%
		Natrium aceticum		0,36%
		Mucilago hydroxyethylcellulosi 8%ASR		10,00%
		Unguentum emulsificans aquosum NSR		50,00%
		Hyaluronatlyase (2500 IU/cm²)		1,30%
		Aqua conservata ASR	ad	100,00%

II. Penetration von Harnstoff aus hyaluronatlyasehaltigen Formulierungen im Vergleich zu Standardemulsionen

Harnstoffkonzentration [mmol/mm³] 10 % Urea in W/O-Emulsion 10 % Urea in W/O-Emulsion + Hyaluronatlyase 30 min 300 min

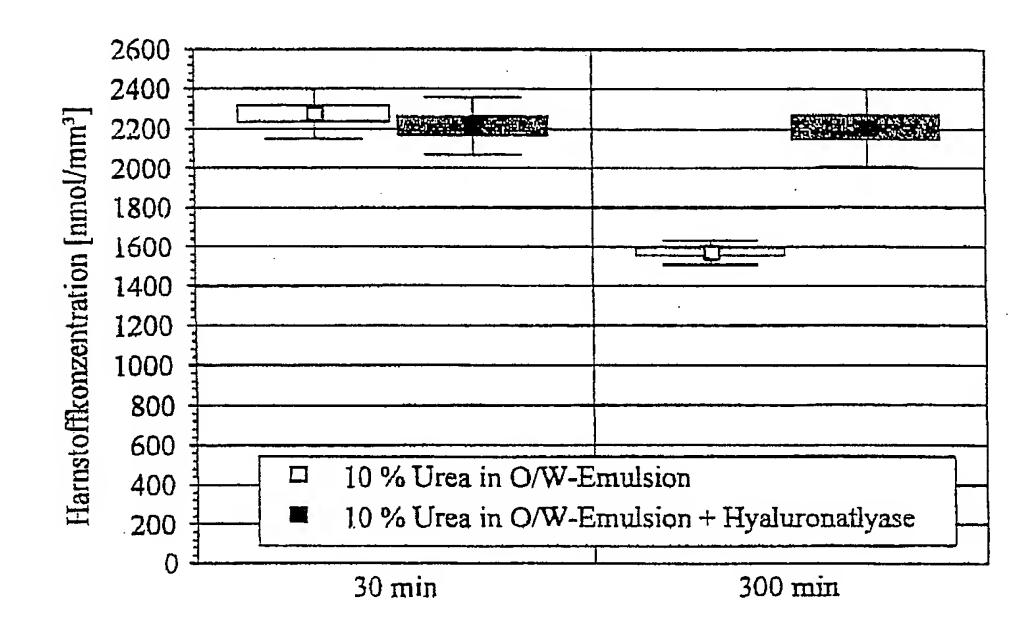


Abbildung 1 Penetration von Hamstoff aus Emulsionen des DAB in das Stratum corneum humaner Haut ex vivo ($p \le 0.05$, n = 3)

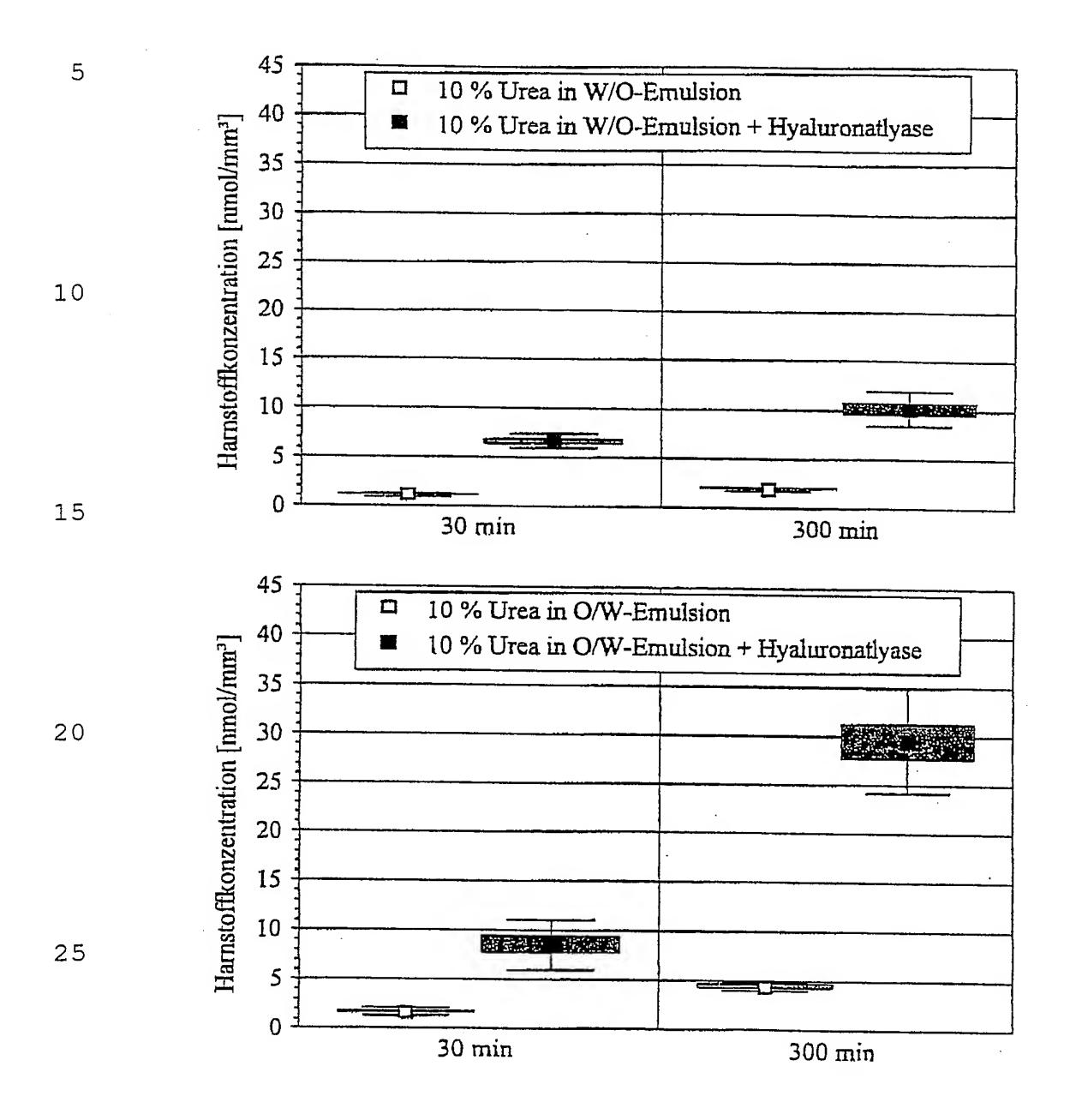


Abbildung 2 Penetration von Harnstoff aus Emulsionen des DAB in die Epidermis humaner Haut ex vivo $(p \le 0.05, n = 9)$

Patentansprüche

5

10

20

25

30

1. Mittel für die topische Anwendung bei der menschlichen oder tierischen Haut und/oder Schleimhaut, enthaltend mindestens einen Penetrationsförderer und mindestens einen Wirkstoff sowie übliche Zusatz- und/oder Hilfsstoffe,

gekennzeichnet dadurch,

daß es als Penetrationsförderer Hyaluronatlyase in Konzentrationen von 100 IU bis 100000 IU pro g Formulierung enthält.

- 2. Mittel nach Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, daß die Hyaluronatlyase aus einem Mikroorganismus durch mikrobielle Fermentation gewonnen worden ist.
- 3. Mittel nach Anspruch 2, gekennzeichnet dadurch, daß die Hyaluronatlyase aus einem Mikroorganismus der Gattung Streptococcus durch mikrobielle Fermentation gewonnen worden ist.
- 4. Mittel nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, gekennzeichnet dadurch, daß die Hyaluronat-lyase aus einem Streptococcus der Art Streptococcus agalactiae durch mikrobielle Fermentation gewonnen worden ist.
- 5. Mittel nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis
 4, gekennzeichnet dadurch, daß die Hyaluronatlyase einen isoelektrischen Punkt im Bereich von

WO 00/38732 PCT/EP99/10337

IP = 8,6, eine Molmasse im Bereich von 116 kD.

6. Mittel nach Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, daß die Hyaluronatlyasekonzentration im Bereich von 50 IU bis 5000 IU liegt.

5

10

15

20

25

30

- 7. Mittel nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6, gekennzeichnet dadurch, daß die Hyaluronatlyase in Form eines gegebenenfalls unter Zusatz von einem oder mehreren Stabilisatoren durch Wasserentzug, insbesondere durch Lyophilisation hergestellten Trockenproduktes mit einer Aktivität von etwa 10000 bis 400000 IU/mg in der Formulierung eingebracht worden ist.
- 8. Mittel nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6, gekennzeichnet dadurch, daß die Hyaluronatlyase in Form einer wäßrigen gepufferten Lösung, gegebenenfalls unter Zusatz von Stabilisatoren, mit Konzentrationen von 10000 bis 20000 IU/mg in dieser Form in die Formulierung eingebracht worden ist.
- 9. Mittel nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 8, gekennzeichnet dadurch, daß es als Paste, Salbe, Creme, Emulsion, Gel, Stiftmasse, bevorzugt als O/W-Emulsion vorliegt.
- 10. Mittel nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 9, gekennzeichnet dadurch, daß in den Formulierungen pharmazeutische Träger und/oder hydrophile und/oder lipophile Wirkstoffe und/oder Hilfsstoffe enthalten sind.
- 11. Mittel nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10, gekennzeichnet dadurch, daß die Hyaluronat-

lyase und/oder die Wirkstoffe und/oder die Hilfsstoffe in kolloidale Trägersysteme vorzugsweise in Nanopartikel, Liposomen oder Mikroemulsionen eingearbeitet vorliegen.

15

PCT/EP99/10337

5

WO 00/38732

12. Mittel nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 11, gekennzeichnet dadurch, daß als hydrophiler Wirkstoff Harnstoff im Konzentrationsbereich von 0,01 bis 0,4 g Harnstoff pro g enthalten.

10

13. Mittel nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 11, gekennzeichnet dadurch, daß als lipophiler Wirkstoff 8-Methoxypsoralen im Konzentrationsbereich von 0,001 bis 0,1 g 8-Methoxypsoralen pro g Formulierung enthalten ist.

15

14. Mittel nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 11, gekennzeichnet dadurch, daß als hydrophiler Wirkstoff Erythromycin im Konzentrationsbereich von 0,001 bis 0,1 g Erythromycin pro g Formulierung enthalten ist.

20

25

15. Mittel nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 11, gekennzeichnet dadurch, daß als lipophiler Wirkstoff Minocyclin im Konzentrationsbereich von 0,001 bis 0,1 g Minocychn pro g Formulierung enthalten ist.

30

35

16. Mittel nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 11, gekennzeichnet dadurch, daß als hydrophiler Wirkstoff Ciclopiroxolamin im Konzentrationsbereich von 0,001 bis 0,1 g Ciclopiroxolamin pro g Formulierung enthalten ist.

WO 00/38732

5

16

PCT/EP99/10337

17. Mittel nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 11, gekennzeichnet dadurch, daß beispielsweise als lipophiler Wirkstoff Glyceroltrinitrat im Konzentrationsbereich von 0,01 bis 0,5 g Glyceroltrinitrat pro g Formulierung enthalten ist.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte onal Application No PCT/EP 99/10337

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K47/46 A61P17/00 A61K31/17 A61K38/46 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC **B. FIELDS SEARCHED** Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K A61P IPC 7 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages Category * Relevant to claim No. GB 1 179 787 A (F. POPPER, S. GOTTFRIED) 1,6,10 28 January 1970 (1970-01-28) See in particular claims 1,11, the examples, and page 2, lines 29-55 1-17 FR 2 448 903 A (MARTIN HENRI) 1-17 12 September 1980 (1980-09-12) cited in the application See in particular claims 1-6, and page 3, line 16 - page 5 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex. Special categories of cited documents: "I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but "A" document defining the general state of the art which is not cited to understand the principle or theory underlying the considered to be of particular relevance invention "E" earlier document but published on or after the international "X" document of particular relevance; the claimed invention filing date cannot be considered novel or cannot be considered to invoive an inventive step when the document is taken alone "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another "Y" document of particular relevance; the claimed invention citation or other special reason (as specified) cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such docu-"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or ments, such combination being obvious to a person skilled other means in the art. "P" document published prior to the international filing date but *&* document member of the same patent family later than the priority date claimed Date of mailing of the international search report Date of the actual completion of the international search 27/04/2000 6 April 2000 Authorized officer Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentiaan 2 NL - 2280 HV Rijewijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo ni, Isert, B Fax: (+31-70) 340-3016

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte onel Application No
PCT/EP 99/10337

teaory *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	The state of the s	
	JEDRZEJAS I J ET AL: "Expression and purification of Streptococcus pneumoniae hyaluronate lyase from Escherichia coli." PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, (1998 JUN) 13 (1) 83-9., XP000881665 See abstract and introduction (lines 83-84)	1-17
	GALIKEEV, KH. L.: "Role of hyaluronidase of streptococci in the corpuscular antigen resorption mechanism and its penetration through the mucous barrier of respiratory tracts" ZH. MIKROBIOL., EPIDEMIOL. IMMUNOBIOL. (1967), 44(3), 60-3, XP002134978 See page 63 (abstract in english)	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Inte onal Application No
PCT/EP 99/10337

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
GB 1179787	A	28-01-1970	DE FR	1767038 A 8032 M	09-09-1971 03-08-1970
FR 2448903	Α	12-09-1980	NONE		

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inte onales Aktenzeichen PCT/EP 99/10337

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 A61K47/46 A61P17/00 A61K31/17 A61K38/46 Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK **B. RECHERCHIERTE GEBIETE** Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 A61K A61P Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile Betr. Anspruch Nr. Kategorie* GB 1 179 787 A (F. POPPER, S. GOTTFRIED) 1,6,10 X 28. Januar 1970 (1970-01-28) * siehe insbesondere Ansprüche 1,11, die Beispiele, & Seite 2, Zeilen 29-55 * 1-17 FR 2 448 903 A (MARTIN HENRI) 1-17 12. September 1980 (1980-09-12) in der Anmeldung erwähnt * siehe insbesondere Ansprüche 1-6, & Seite 3 Zeile 16- Seite 5 * Siehe Anhang Patentfamilie Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, Anmeidung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Theorie angegeben ist Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erkann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden scheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach *& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist Absendedatum des internationalen Recherchenberichts Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 27/04/2000 6. April 2000 Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Bevolkmächtigter Bediensteter Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Isert, B Fax: (+31-70) 340-3016

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter onales Aktenzeichen
PCT/EP 99/10337

	rung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		LD-4- Anna and Ma
Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht komme	enden lelle	Betr. Anspruch Nr.
Y	JEDRZEJAS I J ET AL: "Expression and purification of Streptococcus pneumoniae hyaluronate lyase from Escherichia coli." PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, (1998 JUN) 13 (1) 83-9., XP000881665 * siehe Zusammenfassung und Einleitung (seiten 83-84) *		1-17
	GALIKEEV, KH. L.: "Role of hyaluronidase of streptococci in the corpuscular antigen resorption mechanism and its penetration through the mucous barrier of respiratory tracts" ZH. MIKROBIOL., EPIDEMIOL. IMMUNOBIOL. (1967), 44(3), 60-3, XP002134978 * siehe Seite 63 (Zusammenfassung auf Englisch) *		1-17

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Inte nales Aktenzeichen
PCT/EP 99/10337

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
GB 1179787	Α	28-01-1970	DE 1767038 A FR 8032 M	09-09-1971 03-08-1970
FR 2448903	Α	12-09-1980	KEINE	